

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06087899 A**

(43) Date of publication of application: **29.03.94**

(51) Int. Cl

**C07K 15/14
A61K 39/395
A61K 39/395
C07K 15/12
C12P 21/08
// C12N 15/13
C12N 15/62
C12P 21/02
(C12P 21/08 , C12R 1:91), (C12P 21/02
, C12R 1:91)**

(21) Application number: **03162521**

(22) Date of filing: **07.06.91**

(30) Priority: **13.07.90 JP 02184158**

(71) Applicant: **FUJITA GAKUEN TAKARA
SHUZO CO LTD**

(72) Inventor: **HASHINO JINICHI
KIMIZUKA FUSAO
KATOU IKUNOSHIN
KUROSAWA YOSHIKAZU
CHITANI KOUICHI
SEKIGUCHI KIYOTOSHI**

(54) ARTIFICIAL ANTIBODY

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide an antibody obtained by imparting an antibody having antigen-bonding activity with affinity to cells and macrophages.

cell-adhesion active amino acid sequence. The artificial antibody promotes the phagocytotic action of macrophage, activates other effector cells and contributes to biophylaxis.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

CONSTITUTION: The artificial antibody has antigen-bonding activity and artificial cell-adhesion activity. The artificial cell-adhesion activity is an adhesive activity to cell and is newly expressed as a result of the insertion of a cell-adhesion active amino acid sequence into the objective antibody molecule or the substitution of the amino acid sequence of the antibody molecule with the

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-87899

(43)公開日 平成6年(1994)3月29日

(51)Int.Cl.⁵ 識別記号 序内整理番号 F I 技術表示箇所
C 07K 15/14 8517-4H
A 61K 39/395 H 9284-4C
ABA A 9284-4C
8931-4B C 12N 15/00 A
9281-4B 5/00 B

審査請求 未請求 請求項の数1(全21頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------|----------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願平3-162521 | (71)出願人 | 000125381 学校法人藤田学園 愛知県豊明市栄町南館12番地の1 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)6月7日 | (71)出願人 | 591038141 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地 |
| (31)優先権主張番号 | 特願平2-184158 | (72)発明者 | 橋野 仁一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 宝酒造 株式会社中央研究所内 |
| (32)優先日 | 平2(1990)7月13日 | (72)発明者 | 君塚 房夫 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 宝酒造 株式会社中央研究所内 |
| (33)優先権主張国 | 日本 (JP) | (74)代理人 | 弁理士 中本 宏 (外2名) 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 人工抗体

(57)【要約】

【目的】 抗原結合活性を有する抗体に、細胞及びマクロファージに対する親和性が付加された抗体を提供する。

【構成】 抗原結合活性と人工の細胞接着活性とを有する人工抗体。人工の細胞接着活性とは、細胞接着活性アミノ酸配列を、目的の抗体分子に挿入又は抗体分子のアミノ酸配列と置換した結果、新たに発現された、細胞への接着活性をいう。

【効果】 この人工抗体は、マクロファージの食食作用を促進し、他のエフェクター細胞も活性化して生体防御に寄与する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗原結合活性と、人工の細胞接着活性とを有していることを特徴とする人工抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、人工抗体に関し、更に詳しくは、抗体に人工の細胞接着活性の新機能が付加された多機能性人工抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞と細胞外マトリックスの接着の機構が分子レベルで解明されつつある。細胞外マトリックスタンパク質の中で、細胞の接着に必須の配列が、最初に明らかにされたのは、フィブロネクチン（以下FNと略する）である。すなわち、FNの細胞接着ドメインに存在する配列表の配列番号1で表すアミノ酸配列（以下、R-S配列と称す）が、細胞の接着に必須の単位であることが、ルオスラティラによって明らかにされた〔ネーチャー（Nature）、第309巻、第30～33頁（1984）〕。この配列中、RGDは、細胞の接着に必須であり、他のアミノ酸に置換することができないが、Sは他のアミノ酸、例えば、T、A、C、Vに置き換えることができる。しかし、PやKでは活性を示さないことも記載されている。RGD配列を含むタンパク質は、FNのほかに、トロンビン、フォンビルプラント因子、フィブリノーゲン、コラーゲン、ディスコイディンI、 λ ファージレセプターなどが知られており、RGD配列が、タンパク質の機能と深くかかわっていることが、示唆されている〔プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第81巻、第5885～5988頁（1984）〕。しかしながら、RGD配列がこれらの分子の中で細胞接着活性に寄与しているかどうかは、なお不明な点が多い。例えば、フィブリノーゲンは、R-S配列を持っているにもかかわらず、纖維芽細胞に対して細胞接着活性を示さないことが知られている。前記以外の細胞接着活性タンパク質の例として、ラミニンが知られている。ラミニンは、基底膜に存在する高分子糖タンパク質で、上皮系の種々の細胞に対する接着活性を有する。この接着に関与する最小単位として配列表の配列番号2で表すアミノ酸配列（以下、Y-S配列と称す）が報告されている〔セル（Cell）第48巻、第989～996頁（1987）〕。ラミニンもRGD配列を含むが、これが細胞接着に関与しているか否かは不明である。このほか、FNのIIICSドメインに存在する配列表の配列番号3で表すアミノ酸配列（以下、E-V配列と称す）がリンパ系の細胞やメラノーマ細胞の接着に関与するとの知見もある。一方、抗体とは抗原の刺激により生体内でつくれられ、対応抗原と特異的に結合する活性を有する物質である。免疫グロブリン（Ig）がその機能を担っており、

IgはIgG、IgA、IgM、IgD、IgEのクラスに分類され、それぞれH鎖、L鎖による多重鎖の基本構造より成っている。また抗体は定常部と可変部により構成され、定常部とは遺伝的に決定された恒常的なアミノ酸配列をもった部分であり、可変部とは抗原に対する抗体の結合部位であり、抗体の抗原への特異性によってアミノ酸配列は異なっている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 抗体は機能的に多様で、例えば凝集素、沈降素、溶血素、補体結合抗体、抗毒素、ウイルス中和抗体、アナフィラキシー抗体等の機能が知られている。しかし、前記FN、ラミニン等と同様の作用機能での細胞接着活性については知られていない。生体防御の場において、食作用を示すマクロファージの表面には、R-S配列依存性のレセプターの存在が証明されている〔フェブス レターズ（FEBS Letters）第242巻、第378～382頁（1989）〕。抗体分子内の適当な領域に細胞接着性ペプチド、例えばR-S配列を導入することにより、異物と抗体の免疫複合体に対する食作用の向上が期待できる。また他の細胞性免疫担当細胞の活性化も期待できる。更には生体内で機能している種々の細胞と、該抗体との親和性を高めることにより、抗体の機能が生体内的各組織、細胞の場において促進される。すなわち、本発明の目的は抗原結合活性を有する抗体に、細胞及びマクロファージに対する親和性が付加された抗体を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明は人工抗体に関し、抗原結合活性と人工の細胞接着活性とを有していることを特徴とする。

【0005】 本発明において、抗体とは抗原結合活性を有するものをいい、この免疫学的特性を有するフラグメント、例えばFabフラグメントも使用することができる。また人工の細胞接着活性とは、細胞接着活性アミノ酸配列を、目的の抗体分子にタンパク工学的手法や遺伝子工学的手法により、挿入又は抗体分子のアミノ酸配列と置換した結果、新たに発現された、細胞への接着活性を意味する。細胞接着活性アミノ酸配列とは、例えば前述のRGD、Y-R、E-V配列があり、抗体に細胞接着活性を付与できる配列であれば良い。該細胞接着活性アミノ酸配列の抗体分子上の位置は、抗体分子の抗原活性を損なわない位置であれば良いが、三次元構造的に抗体分子の表面に露出し、親水性に富む領域が好ましい。用いる細胞接着活性アミノ酸配列、該配列の抗体分子上の位置を検討し、その細胞接着活性を測定し、最適の人工抗体を選択すれば良い。

【0006】 遺伝子工学的に発現可能な抗体であれば、この抗体をコードするDNA配列内に、前述の細胞接着活性アミノ酸配列をコードするDNA配列を例えれば読み取

りフレームが合うように接続し、このDNA配列を含有するプラスミドを用い、抗体産生可能な細胞を用い、その形質転換を行えば良い。この形質転換体を組織培養中、又は生体内で増殖させることにより、目的の人工抗体を産生させることができる。

【0007】遺伝子工学的に発現される抗体としては、例えば抗ホスホリルコリン IgG [フェブス レターズ、第244巻、第303~306頁(1989)]がある。該抗体は、マウス由来抗ホスホリルコリン抗体のH鎖可変部をコードするDNA配列及びヒトIgGガンマ型H鎖定常部DNA配列を組込んだプラスミドpSV2HG1Vpc及びマウス由来抗ホスホリルコリン抗体のL鎖可変部をコードするDNA配列及びヒトIgGカッパ型L鎖定常部DNA配列を組込んだプラスミドpSV2HCκVpcでマウスミエローマSP2/0細胞を形質転換することにより産生されるヒト/マウスキメラ型の抗体である。この抗体をコードするDNA配列、例えばヒトIgGガンマ型H鎖定常部CH3をコードするDNA配列内に、例えば前述のR-S配列をコードするDNA配列が挿入される様に部位特異的の変異(Site-directed mutagenesis)の手法で細胞接着活性アミノ酸配列をコードするDNA配列を読み取りフレームが合うように接続する。この改変された、ヒトIgGガンマ型H鎖定常部をコードするDNA配列と、マウス由来抗ホスホリルコリン抗体のH鎖可変部をコードするDNA配列を接続し、このDNA断片を含有するプラスミドと、例えば前述のプラスミドpSV2HCκVpcでSP2/0細胞を形質転換すれば、細胞接着活性アミノ酸配列の付加された抗ホスホリルコリン抗体産生細胞を得ることができる。形質転換体により産生された抗体は、必要に応じイオン交換クロマトグラフィーやアフィニティーコロマトグラフィー等を行うことにより、精製される。

【0008】タンパク工学的手法や、遺伝子工学的手法により、細胞接着活性アミノ酸配列の付加された抗体の細胞接着活性は、例えば、ルオスマテイの方法に準じて測定することができる【メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第82巻、第803~831頁、(1981)】。すなわち、試料をPBS等に溶かして、マイクロタイタープレートに吸着させ、BSAでブロッキングした後、あらかじめ、前培養したBHK又はNRK細胞を添加し、37℃でインキュベートする。顕微鏡下に、細胞の伸展を観察することにより、細胞接着活性の有無を判定する。その結果として、例えばR-S配列を持たない抗ホスホリルコリンIgGは、細胞接着活性を持たないが、R-S配列を組込んだ抗ホスホリルコリンIgGには、細胞接着活性が付加されていることが証明される。また該改変抗体の抗原結合活性は例えばホスホリルコリン-KLHへの結合性を測定することにより証明される。該抗体の細胞接着活性の発現は組込んだR-S配列に依存しているが、R-S配

列のSは他のアミノ酸、例えばV、A、T、C、Fに変えても細胞接着活性があり、R-S配列のSは、V、A、T、C、F等に置換しても良い。これらのR-S関連配列、前述のY-R、E-V配列等の細胞接着活性アミノ酸配列は遺伝子工学的手法により適当な制限酵素サイト部位に、また適当な制限酵素サイトがない場合でも、部位特異的変異の手法を用いれば、任意の部位に目的のアミノ酸配列を組込むことができる。しかし、その結果として、細胞接着活性が付加されるかどうかを予測することは容易でない。すなわち、組込まれる部位が、細胞の受容体に認識され得る立体構造を保持していることが重要である。

【0009】抗体H鎖定常部に細胞接着活性配列を付加したアミノ酸配列をコードするDNAに、H鎖可変部アミノ酸配列をコードするDNAを接続することにより、細胞接着活性配列を有する抗体H鎖をコードするDNAを作成することができる。

【0010】抗体H鎖定常部に細胞接着活性配列を付加したアミノ酸をコードするDNAとしては、例えばヒトIgGガンマ型H鎖定常部DNA配列中にR-S配列をコードするDNAを組込んだ配列表の配列番号4で示すDNAであり、該DNAを組込んだプラスミドpSV2-HG1-gpt-CT2を保有する大腸菌としては、Escherichia coli HB101/CT2 微研条寄第3399号(FERM-B-3399)がある。例えば、該微生物より、プラスミドを調製し、該プラスミドに任意の抗体のH鎖可変部をコードするDNAを組むことにより、細胞接着配列を有する抗体H鎖をコードするDNAを有するプラスミドを簡便に調製することができる。次いで例えば対応する抗体L鎖をコードするDNAを有するプラスミドと共に宿主を形質転換することにより、人工の細胞接着能の付与された抗体を遺伝子工学的に製造することができる。任意のH鎖可変部とは、例えばヒト型、マウス型であり、その認識抗原は、例えば腫瘍抗原、糖鎖抗原である。

【0011】以上、詳細に説明した様に、本発明により、人工の細胞接着活性が付加され、細胞への親和性が増強された抗体が提供される。これらの多機能性抗体は、抗体とエフェクター細胞より成る生体防御の場において有用である。また、抗体の生体組織への指向性が増加し、組織での抗体の効果が増強される。

【0012】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0013】実施例1

R-S配列を含むIgGを発現するプラスミドの構築
本発明者らが先に調製した前述フェブス レターズ記載のプラスミドpSV2-HG1gptにはヒトIgGガンマ鎖の定常部領域をコードする構造遺伝子が含有され

ている。この p SV2-HG1 g p t のプラスミド地図を図1に、構造遺伝子の一部のDNA配列を配列表の配列番号5に示す。すなわち図1はプラスミド p SV2-HG1 g p t の構成を示す図、図2は図1のプラスミドの一部の、制限酵素の切断部位、及びヒトIgGH鎖の定常部をコードする領域を示す図である。配列表の配列番号5で表されるDNA中、塩基番号209～502はCH1をコードする領域、塩基番号891～935はヒンジをコードする領域、塩基番号1054～1383はCH2をコードする領域、塩基番号1480～1800はCH3をコードする領域、塩基番号1832～1851及び塩基番号1939～1960はPCRを行うためのプライマー作成に使用する領域、塩基番号1902～1908はポリ(A)部位である。この p SV2-HG1 g p t の115 μgを制限酵素反応用T-バッファー(33mM トリス・酢酸、pH7.9、10mM 酢酸マグネシウム、0.5mM ジチオスレイトール、6.6mM 酢酸カリウム)を含む反応液105 μl中でSma Iの50ユニットを用いて、37℃、2時間分解した。この反応液を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、IgGのガンマ鎖CH3ドメインをコードする遺伝子を大部分含む約0.3 kbpのDNA断片を精製した。次に、プラスミド p UC118の5 μgを制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液26 μl中でSma Iの10ユニットを用いて37℃、2時間分解した。この分解反応液に、大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ0.6ユニットを加え、65℃、1時間反応させた。この反応液に等容のTE(10mM トリス・HCl、pH8.0、1mM EDTA)飽和フェノールを加え、かくはんの後、室温で12,000 rpm、5分間遠心し、上清(水層)を得た。この上清に対し等容のフェノール・クロロホルム混液(TE飽和フェノール1容のクロロホルム1容を混合したもの)を加え、かくはん後、室温で12,000 rpm、5分間遠心し、上清を得た。この上清に対し、等容のクロロホルムを加え、かくはん後、室温で12,000 rpm、5分間遠心し、上清(水層)を得た。この上清より、エタノール沈殿法にてDNA断片を回収した。このSma Iで分解し、脱リン酸化した p UC118と、先のIgGのガンマ鎖CH3ドメインをコードする遺伝子を大部分含む約0.3 kbpのDNAをライゲーションバッファー(6.6mM トリス・HCl、pH7.6、6.6mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、0.5mM ATP、10% PEG6000)中で、300ユニットのT4 DNA配列リガーゼを用い、37℃、1時間ライゲーション反応を行い、0.3 kbpのDNAが組込まれたプラスミドを得た。次にこのプラスミドを用いて大腸菌DH5を形質転換した。この転換体を50 μg/mlのアルビシンを含むL-寒天培地プレート(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5% NaCl、1.5% 寒天)に塗布し、プレート上に生

育したコロニーをL-プロス(1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl)で培養し、培養終了後菌体からプラスミドを抽出した。得られたプラスミドの一部を用いて、制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液10 μl中で制限酵素Sma Iの10ユニット、RNase A 0.5 μgを用いて、37℃、2時間反応させた。この反応液を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約0.3 kbpのバンドの検出を確認した。この0.3 kbpの検出が確認されたプラスミドを選択し、これらのプラスミドについては更に、制限酵素反応用H-バッファー(50mM トリス・HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール、100mM NaCl)を含む反応液20 μl中で、制限酵素BamHI 12ユニット、Nsi I 10ユニット、RNase A 0.5 μgを用いて、37℃、2時間反応させた。この反応液を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、予測される約230 bpのバンドの出現も確認した。前記0.3 kbp及び230 bpのバンドの出現するプラスミドを選択し、プラスミド p UC-CH3と命名した。p UC-CH3の構築工程を図3に示す。

【0014】次に部位特異的変異を行うために、常法に従い、この p UC-CH3を用い、下記の様に1本鎖DNAのdU-ssDNA p UC-CH3を調製した。すなわち、まず初めに p UC-CH3を用いて、大腸菌MV1184を形質転換した。次に、150 μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに形質転換体を塗布し、プレート上に生育したコロニーの一つを150 μg/mlのアンピシリンを含むL-プロス中で、37℃、一晩培養した。次にこの培養液10 μlを2mlの2YT(1.6% バクトリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl)に加え、ヘルパーファージM13K07の20 μlを添加し、37℃、30分間静置後、70 μg/mlの濃度となるようカナマイシンを加え、37℃、230 rpm、16時間培養した。この培養液を12,000 rpm、4℃、10分間遠心し、培養上清を集め、この上清20 μlをあらかじめL-プロス中で培養しておいた大腸菌BW313株に加えて、形質転換し、この転換体を150 μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに植菌した。37℃で一晩培養した後、生育したコロニーを一つ選び、150 μg/mlのアンピシリンを含む2YT培地に植菌し、20 μlのヘルパーファージM13K07を加え、37℃、30分間静置した後、70 μg/mlの濃度となるようカナマイシンを加え、230 rpm、37℃、一晩培養した。この培養液1.5 mlを、12,000 rpm、10分間遠心し、1 mlの培養上清を回収した。この培養上清に250 μlの20% PEG6000-2.5M NaClを加え、室温で30分静置した後、12,000 rpm、10分間遠心し、上清を除き、得られた沈殿に、100 μlのTEを加えて溶かし、次にフェノール抽出を行い、

除タンパク質の後、エタノール沈殿を行い、デオキシリジン(dU)の取込まれた1本鎖DNA、すなわちdU-ssDNA pUC-CH3を得た。

【0015】細胞接着活性アミノ酸配列を付加する位置として、配列表の配列番号5のCH3をコードするDNA配列中の第1788番目のGと第1789番目のTの間に選定した。この間に配列表の配列番号6で表すアミノ酸配列をコードするDNA配列を挿入することにより目的のR-S配列が出現する。部位特異的変異を行うための配列表の配列番号7で表すDNA断片をDNA合成機で合成し、脱保護した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。dU-ssDNA pUC-CH3の0.2pmolと配列表の配列番号7で表すDNA鎖の5'末端をリン酸化した合成DNA 1pmolと共に20mMトリス・HC1、pH8.0、10mM MgCl₂、5mM NaCl、1mM ジチオスレイトールを含む反応液10μl中で65℃、15分間、37℃、15分間静置し、アニールさせた。次に50mM トリス・HC1、pH8.0、0.60mM 酢酸アンモニウム、5mM MgCl₂、5mM DTT、1mM NAD、0.5mM dNTP(G、A、T、C)を含む反応液25μlを加えた後、1ユニットのT4DNAポリメラーゼと60ユニットのT4DNAリガーゼを加え、25℃、120分間反応させ、2本鎖環状DNAを合成した。合成された2本鎖環状DNAの一部を用いて、大腸菌BMH71-18mut S株を形質転換した後、ヘルパーFAージM13K07を感染させ、37℃、230rpmで、一晩培養した。培養液を12,000rpm、5分間遠心して、培養上清を調製し、一晩培養しておいて大腸菌MV1184と混ぜ、150μg/mlのアンピシリンを含む、L-寒天培地に植菌し、37℃、一晩培養した。生育したコロニーを2mlの150μg/mlのアンピシリンを含む2YTに植菌し、20μlのヘルパーFAージM13K07を加え、37℃、30分間静置した後、70μg/mlとなるようにカナマイシンを加え、37℃、230rpmで、一晩培養した。培養上清を集め、1本鎖DNAを調製し、M13ジデオキシ法でDNAの塩基配列を分析した。配列が、配列表の配列番号8で示すDNA配列、及びアミノ酸配列から配列表の配列番号9で示すDNA配列、及びアミノ酸配列に変換されているクローニングを選び、2本鎖DNAを調製した。得られた、新たにR-S配列をコードするDNA配列が付加されたプラスミドをpUCCT1と命名した。

【0016】次に細胞接着活性アミノ酸を付加する位置として、配列表の配列番号5の、CH3をコードするDNA配列中の第1704番目のCと第1705番目のAの間に選定した。この間に配列表の配列番号10で表すアミノ酸配列をコードするDNA配列を挿入することにより目的のR-S配列が出現する。部位特異的変異を行うための配列表の配列番号11で示すDNA断片をDN

A合成機で合成し、脱保護した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。次に該DNA断片と前述dU-ssDNA pUC-CH3を用い、pUCCT1の作成手順に従い、配列が配列表の配列番号12で示すDNA配列及びアミノ酸配列から配列表の配列番号13で示すDNA配列及びアミノ酸配列に変化されているクローニングを選び、2本鎖DNAを調製した。得られた、新たにR-S配列をコードするDNA配列が付加されたプラスミドをpUCCT2と命名した。

10 【0017】(2) ポリ(A) フラグメントの調製

1g Gガンマ鎖のCH3ドメインをコードしている遺伝子の下流に転写に関与するポリ(A)部位が存在する。先の項目の約0.3kbpの断片のすぐ下流から、この領域を含む断片を調製するために、配列表の配列番号14及び配列番号15でそれぞれ表される二種類のDNAを前述と同様に合成、リン酸化し、この合成DNAをプライマーとし、pSV2-HG1gptをテンプレートとし、ポリメラーゼ チェイン リアクション [Polymerase chain reaction : サイキ(Saiki)ら、サイエン

20 ス(Science)、第230巻、第1350~1354頁(1985)]を行った。すなわち、これら二種類のプライマーをそれぞれ、1.0μmolとテンプレートDNAを0.1μgを200μM dNTP(dGTP、dATP、dTTP、dCTP)、50mM KC1、10mM トリス・HC1、pH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチンを含む反応液100μl中、2.5ユニットのタックDNAポリメラーゼを用いて、両プライマーの間、約130bpを増幅した。反応条件は94℃、2分間の熱変性工程、37℃、3分間のアニ

30 リング工程、72℃、4分間のDNA鎖伸長工程の3工程を順に25回繰返した。反応後、増幅されたDNAをフェノール抽出、エタノール沈殿にて回収し、50μlのTEに溶かした。増幅されたDNAをPOLAPCRと命名した。

【0018】(3) 1g Gガンマ鎖の定常領域をコードする遺伝子を含むDNA断片のサブクローニング
プラスミドpSV2-HG1gpt 57.5μgを制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液105μl中で制限酵素EcoRI 30ユニット、BamHI 30ユニットを用いて、37℃、2時間反応させた。反応液を

40 0.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約8.5kbpのバンドを電気溶出法にてゲルより溶出させた。得られたDNA溶液を、フェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。回収したDNAは、50μlのTEに溶かし、この一部をあらかじめEcoRIとBamHIで分解し、大腸菌のアルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化したベクターpUC118の0.2μgとライゲーションバッファーを含む反応液20μl中、300ユニットのT4DNAリガーゼを用い、37℃、1時間反応させた。この反応液の一部を用いて、大腸菌DH5を形質転

換した。次に、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-プロスで、培養し、菌体からプラスミドを抽出した。この抽出されたプラスミドの一部を用いて、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液 $10 \mu\text{l}$ 中でEcoRIとBamHIそれぞれ12ユニットとRNaseA $0.5 \mu\text{g}$ を用いて、 37°C 、2時間反応させた。この反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約8.5 kbpのバンドを検出したプラスミドを選択し、pUC118-HG1と命名した。該プラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図4に示す。なお、以下、図中ERはEcoRI、EはEcoT22I、BはBamHIをそれぞれ示す。

【0019】(4) 改変pSV2-HG1 gptの構築
① 先に得られたpUCCT1の $17.4 \mu\text{g}$ を $60.75 \mu\text{l}$ の反応液中SmaI 7.5ユニットを用いて、反応を行った。反応は、SmaIを加えることによって開始し、反応開始後、30、60、90、150、210、270秒に $10 \mu\text{l}$ の反応液を抜取り、順次、あらかじめ用意しておいてTE飽和フェノール $60 \mu\text{l}$ に加え、強くかくはんすることを繰返し、反応を停止させた。フェノール抽出後の反応液から、エタノール沈殿によってDNAを回収し、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かし、1.2ユニットの大腸菌のアルカリ性ホスファーゼを用いて、 65°C 、1時間反応させ、脱リン酸化した。反応液をフェノール抽出、エタノール沈殿の後、DNAを回収し $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かした。この溶液 $10 \mu\text{l}$ と、先に調製したPOLAPCR $10 \mu\text{l}$ を用いて、ライゲーションバッファーを含む反応液中で、300ユニットのT4DNAリガーゼを用いて、 37°C 、1時間反応させ、pUCCT1のSmaI部位分解物と、POLAPCRとを結合させた。この反応液の一部を用いて、大腸菌MV1184を形質転換した。次に、 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-プロスで培養し、菌体からプラスミドを抽出した。この抽出されたプラスミドは、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かし、一部を用いて、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液 $15 \mu\text{l}$ 中で12ユニットのBamHIと $0.5 \mu\text{l}$ のRNase Aを用いて、 37°C 、2時間反応させた。この反応液を2%アガロースゲル電気泳動にかけ、約450 bpにバンドを検出したプラスミドを選択し、pUCCT1・POLAPCRと命名した。該プラスミドの構築図、及びその制限酵素の切断部位を示す図を図5に示す。なお、以下、図中黒逆三角印は配列表の配列番号6のアミノ酸配列をコードするDNAが付加された部位、SはSmaIをそれぞれ示す。次に、このプラスミドpUCCT1・POLAPCR $20 \mu\text{l}$ を用い、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液 $30 \mu\text{l}$ 中、それぞれ12ユニットのEcoT22IとBamHI及び $0.25 \mu\text{g}$ の

RNase Aを用いて、 37°C 、2時間反応させた。反応液を2%アガロースゲル電気泳動にかけ、約220 bpのバンドをDEAE-ペーパーを用いた電気溶出法にてゲルより溶出させ、得られたDNA溶液から、フェノール抽出、エタノール沈殿により、DNAを回収した。回収されたDNAは、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶解し、後述のライゲーション反応に用いた。次に、先に得られたpUC118-HG1の $25 \mu\text{l}$ を用い、制限酵素反応用H-バッファー $30 \mu\text{l}$ 中で、EcoRI 12ユニット、EcoT22I 12ユニット、RNase A $0.25 \mu\text{g}$ と 37°C 、2時間反応させた。反応液は、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1750 bpのバンドをDEAE-ペーパーを用いた電気溶出法にて、ゲルより溶出させ、得られたDNA溶液から、フェノール抽出、エタノール沈殿法によりDNAを回収した。回収したDNAは、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かした。更に、前述pSV2-HG1 gpt $11.5 \mu\text{g}$ を制限酵素反応用Hバッファーを含む $30 \mu\text{l}$ の反応液中、12ユニットのEcoRIと12ユニットのBamHIと 37°C 、2時間反応させ、反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約4.6 kbpのバンドをDEAE-ペーパーを用いた電気溶出方法にて、ゲルより溶出させた。得られたDNA溶液から、フェノール抽出、エタノール沈殿方法により、DNAを回収し、回収した約4.6 kbpのDNAを、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かした。上述のpUCCT1・POLAPCRより調製した約220 bpのDNA断片、pUC118-HG1より調製した約1750 bpのDNA断片、pSV2-HG1 gptより調製した約4.6 kbpのDNA断片の溶液を、それぞれ $4 \mu\text{l}$ 、 $5 \mu\text{l}$ 、 $5 \mu\text{l}$ 用い、 $20 \mu\text{l}$ のライゲーションバッファー中、300ユニットのT4DNAリガーゼと、 37°C 、1時間反応させた。この反応液の一部を用いて、大腸菌HB101を形質転換し、 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL-プロス中で培養し、プラスミドを抽出した。この抽出したプラスミドは、 $50 \mu\text{l}$ のTEに溶かした。まず、このプラスミド溶液 $3 \mu\text{l}$ を制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液 $10 \mu\text{l}$ 中、6ユニットのEcoRIとEcoT22I、 $0.25 \mu\text{g}$ のRNase Aと 37°C 、1時間反応させ、反応液を2%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1.75 kbpのバンドが、検出されることを確認した。また、先に、ポリ(A) フラグメントの調製に用いた2種類の合成DNAをプライマーとし、これらの選択されたプラスミドをテンプレートとしてポリメラーゼ・チエイン・リアクションを行い、約130 bpのDNA断片が増幅されることを確認した。得られたプラスミドをpSV2-HG1 gpt・CT1と命名した。該約6.6 kbのプラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図6に示す。

【0020】② 先に得られたpUCCT2の23.2 μgを制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液302 μl中でSmaI 20ユニットを用いて37℃、12時間分解した。この反応液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約0.3 kbpのDNA断片を精製した。このうちの一部をあらかじめSmaIで分解し、大腸菌のアルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化したベクター-pUC19の1.5 μgとライゲーションバッファーを含む反応液60 μl中、300ユニットのT4DNAリガーゼを用いて、37℃、1時間反応させた。この反応液の一部を用いて、大腸菌HB101を形質転換した。次に、50 μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを、50 μg/mlのアンピシリンを含むL-プロスで培養し、菌体からプラスミドを抽出した。この抽出されたプラスミドの一部を用いて、制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液15 μl中でSmaI 10ユニットとRNase A 0.5 μgを用いて、37℃、2時間反応させた。この反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.3 kbpのバンドを検出したプラスミドを選択した。これらのプラスミドの一部を更に制限酵素反応用バッファーを含む反応液15 μl中で、それぞれ6ユニットのEcoRIとEcoT22I、0.5 μgのRNase Aを用いて、37℃、2時間反応させた。この反応液を6%アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約0.25 kbpのバンドを検出したプラスミドを選択した。このプラスミドを、pUC19-CT2と命名した。該プラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図7に示す。なお、以下図中▽は配列表の配列番号10のアミノ酸配列をコードするDNAが付加された部位を示す。次に、このpUC19-CT2を20 μg用い、制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液52 μl中で1 μgのRNase Aと37℃、1時間反応させた。この後、同反応液に7.5ユニットのSmaIを添加し、添加時より30、60、90、150、210秒後に10 μlずつ反応液を抜き取り、フェノール処理を行い反応を停止させた。反応停止後の反応液を集め、エタノール沈殿法によりSmaI部分分解DNAを回収した。回収されたDNAを50 μlのTEに溶かし2 μlの大腸菌アルカリ性ホスファターゼを加え、65℃で1時間反応させた。この反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約2 kbpのDNAを電気溶出法にて回収した。回収されたDNAをフェノール処理、エタノール沈殿法にて精製し、50 μlのTEに溶かした。この溶液7 μlを前述のPOLAPCRの8 μlと、ライゲーションバッファーを含む60 μlの反応液中、450ユニットのリガーゼを用い、37℃、1時間反応させた。この反応液の一部を用い、大腸菌HB101を形質転換させ、50 μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを50 μg/mlのアンピシリンを含むL-プロスで培養し、菌体からプラスミドを抽出した。

らプラスミドを抽出した。この抽出されたプラスミドは、50 μlのTEに溶かし、11.5 μlを用い、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液15 μl中、6ユニットのBamHIとEcoRIと0.5 μgのRNase Aを用いて、37℃、1時間反応させた。この反応液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約0.45 kbpのバンドを検出したプラスミドを選択した。これらのプラスミドをそれぞれ、11.5 μl用い、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液15 μl中、6ユニットのBamHIと0.25 μgのRNase Aを用いて、37℃、1時間反応させた。この反応液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、3.1 kbpのバンドのみを検出したプラスミドを選択し、pUC19-CT2・POLAPCRと命名した。該プラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図8に示す。次に、207 μgのpSV2-HG1 gptを制限酵素反応用T-バッファーを含む103 μlの反応液中30ユニットのSmaIを用いて37℃、1時間、反応を行った。この反応液を用いて、制限酵素反応用H-バッファーを含む206 μlの反応液中36ユニットのBamHIを用い、37℃、1時間反応させた。この反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ約6.1 kbpのDNA断片①をDEAE-ペーパーを用いて精製した。次に前述のpUC19-CT2を45 μl用いて、制限酵素反応用T-バッファーを含む反応液中、20ユニットのSmaIと、37℃、1時間反応させた。この反応液を更に、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液中、24ユニットのEcoT22Iと0.5 μgのRNase Aを用い、37℃、1時間反応させた。この反応液を2%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.24 kbpのDNA断片②を精製した。次に、先に作成したプラスミドpUC19-CT2・POLAPCRを用いて、制限酵素反応用H-バッファーを含む50 μlの反応液中で、24ユニットのBamHI、24ユニットのEcoT22Iと0.5 μgのRNase Aを用い、37℃、1時間反応させた。この反応液を、2%アガロースゲル電気泳動にかけ、約0.21 kbpのDNA断片③を精製した。次にこれらDNA断片①、②、③をライゲーションバッファーを含む反応液中で、300ユニットのT4DNAリガーゼと、37℃、1時間反応させた。この反応液の一部を用い、大腸菌HB101を形質転換した。次に50 μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを50 μg/mlのアンピシリンを含むL-プロスで培養し、菌体からプラスミドを抽出した。この抽出されたプラスミドの一部を用いて、制限酵素反応用H-バッファーを含む反応液15 μl中でそれぞれ6ユニットのEcoRIとBamHI、0.5 μgのRNase Aを用いて37℃、90分反応させた。この反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約4.6 kbpと2.0 kbpのバンドを検出したプラスミドをpSV2・

HG1・gpt・CT2と命名した。該プラスミドの構築図、及びその制限酵素の切断部位を示す図を図9に示す。次に該プラスミドで大腸菌HB101を形質転換した。この形質転換された大腸菌はEscherichia coli HB101/CT2と命名、表示され、工業技術院微生物工業技術研究所に微研条寄第3399号(FERM BP-3399)として寄託されている。該Escherichia coli HB101/CT2より調製したpSV2・HG1・gpt・CT2には、任意のH鎖可変部をコードする領域を含むDNAを組込み、改変H鎖を作成することができる。

【0021】(5) 改変IgG発現ベクターの構築
 前述のマウス由来抗ホスホリルコリン抗体のH鎖可変部及びヒトIgGガンマ型H鎖定常部のDNA配列を含有するプラスミドpSV2HG1Vpcを15μg用い、制限酵素反応用H-バッファーを含む100μlの反応液中、36ユニットのEcoRIと37℃、2時間反応させた。この反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、H鎖可変部をコードする約7.6kbpのバンドをDEAE-ペーパーを用いた電気溶出法にて溶出させ、得られたDNA溶液からフェノール抽出、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAは、50μlのTEに溶かした。次に、前述pSV2・HG1・gpt・CT1の13.5μgを制限酵素反応用H-バッファーを含む、53μlの反応液中、36ユニットのEcoRIと37℃、2時間反応させた後、大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ1.2ユニットを加え、65℃、1時間反応させた。この反応液から、フェノール抽出、エタノール沈殿によりDNAを回収し、50μlのTEに溶かした。前述のpSV2HG1Vpcより調製した約7.6kbpのDNA断片溶液5μlと、このpSV2・HG1・gpt・CT1をEcoRIで分解し、脱リン酸化し調製した6.6kbpのDNA断片溶液3μlをライゲーションバッファーを含む20μlの反応液中300ユニットのT4DNAリガーゼと37℃、1時間反応させた。この反応液の一部を用いて、大腸菌HB101を形質転換し、50μg/mlのアンピシリンを含むL-寒天培地プレートに生育したコロニーを、50μg/mlのアンピシリンを含むL-プロス中で培養し、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを50μlのTEに溶かし、一部を用いて制限酵素反応用H-バッファーを含む10μlの反応液中、6ユニットのEcoRIと、0.25μgのRNaseAと37℃、2時間反応させ、反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約7.6kbpと約6.6kbpのバンドを検出したプラスミドを選択し、これについて、制限酵素反応用H-バッファーを含む10μlの反応液中、12ユニットのStuIと0.25μgのRNaseAと、37℃、2時間反応させ、反応液を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、約6.3kbpと5.4kbp、2.5kbpのバンドを検出したプラスミ

ドを選択した。選択したプラスミドをpSV2・HG1・Vpc・CT1と命名した。該プラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図10に示す。次に上記方法に準じ、pSV2・HG1・gpt・CT2のEcoRI処理物に、pSV2HG1VpcのEcoRI断片を挿入し、H鎖可変部及びR-S配列が付加されたH鎖定常部をコードするDNAが組込まれたプラスミドを調製し、該プラスミドをpSV2・HG1・Vpc・CT2と命名した。該プラスミドの構築図及びその制限酵素の切断部位を示す図を図11に示す。

【0022】実施例2

(R-S配列を含むIgGの生産と精製)

- (1) マウス・ミエローマ細胞SP2/0の形質転換
 10%ウシ胎児血清(FCS)、ペニシリン50単位/ml、ストレプトマイシン50μg/mlを含む RPMI 1640培地(以下、基本培地とする)中で、マウス・ミエローマ細胞SP2/0を十分に増殖させた培養液100mlを20℃、1000rpm、10分間遠心し、細胞を集め。集めた細胞を10mlのPBS(8g/1 NaCl、0.2g/1 KC1、1.15g/1 Na₂HPO₄、0.2g/1 KH₂PO₄)に懸濁し、20℃、1000rpm、10分間遠心し、再び細胞を集め、10mlのPBSに懸濁する。これを、20℃、1000rpm、10分間遠心し、細胞を集め。この細胞に、あらかじめpSV2・HG1・Vpc・CT1とマウス由来抗ホスホリルコリン抗体のL鎖可変部領域をコードするDNA配列とヒトIgGカッパ型L鎖の定常部領域をコードするDNA配列を含む前述のプラスミドpSV2CκVpcをそれぞれ50μgずつ1mlのPBSに溶かし、氷中で冷却しておいてDNA溶液を加え、懸濁し、遺伝子導入用セルに移し、氷中で10分間冷却した後、4500V/cm、50μsecの電気パルスを3回かけ細胞中へプラスミドを導入した。この後、氷中で10分間冷却し、20mlの基本培地中へ細胞懸濁液を回収し、37℃、3日間培養した。この後、基本培地に250μg/mlのキサンチン、10μg/mlのミコフェノール酸を含む選択培地と交換し、96穴の培養皿に移し、37℃で培養した。なお、対照区として、マウス由来抗ホスホリルコリン抗体のH鎖可変部領域をコードするDNA配列とヒトIgGガンマ型H鎖の定常部領域をコードするDNA配列を含む前述のプラスミドpSV2HG1Vpc、及び前述プラスミドpSVCκVpcを用いて、同様にマウス・ミエローマ細胞SP2/0を形質転換した。
- 【0023】(2) 陽性クローニングの選択**
 ELISA用96穴プラスチックプレートに10μg/mlの抗マウスIgG・Fab断片モノクローナル抗体PBS溶液を1穴当たり50μl入れ、室温で2時間吸着させた。この後、この液を除き、1%ウシ血清アルブミンウシPBS溶液を、1穴当たり、400μl加え、室温で

1時間ブロックする。ブロック後、0.05%ツィーン（Tween）20を含むPBS溶液でプレートを3回洗い、1穴当り50μlの培養上清を入れ、室温で1時間反応させた。反応液、0.05%ツィーン20を含むPBSでプレートを洗い、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識・抗ヒトIgG/Fc断片抗体（カペル社製）のPBS溶液を1穴当り50μl添加し、室温で1時間反応させた。反応後、プレートを0.05%ツィーン20を含むPBSで洗った。洗浄したプレートに過酸化水素・o-フェニレンジアミン溶液を加え、室温で20分間反応後、1M硫酸で反応を止め、492nmの吸収を測定し、陽性クローンを選択した。得られた陽性クローン中、最も抗体産生能の高いクローンをミエローマSP2-PCCT1と命名し、Myeloma SP2-PCCT1と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に微研菌寄第11547号（FERM P-11547）として寄託されている。

【0024】(3) 次にpSV2·HG1·Vpc·CT2を用い、上記実施例2-(1)、(2)に準じ処理を行い、ミエローマSP2/0にpSV2·HG1·Vpc·CT2及びpSV2CκVpcを組込み、最も抗体産生能の高いクローンをミエローマSP2-PCCT2と命名した。該ミエローマはMyeloma SP2-PCCT2と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に微研菌寄第3390号（FERM BPP-3390）として寄託されている。

【0025】(4) IgGの精製

ミエローマSP2-PCCT1（FERM P-11547）及びミエローマSP2-PCCT2（FERM BPP-3390）をそれぞれ選択培地中で培養し、各500mlの培養上清を得た。この培養上清を、ピアス社イムノピュア（Immuno Pure）IgGピュリフィケーションキット（Purification Kit）を用いて精製し、ミエローマSP2-PCCT1から抗体・CT1、ミエローマSP2-PCCT2から抗体・CT2各約100μgを得た。また、対照区のミエローマよりも抗体約100μgを調製した。

【0026】実施例3

〔細胞接着活性の測定〕前例で得られたR-S配列を含むヒト・マウス・キメラ抗体、CT1及びCT2、R-S配列を含まない対照のヒト・マウス・キメラ抗体、血しょうFNを用いて、BHK細胞に対する細胞接着活性を測定した。試料はすべて、PBSに溶かし、96穴プラスチックプレートに1穴当り50μlを添加し、4℃で一晩吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSAを含むPBS 100μlを加え、室温で3~4時間インキュベートした後、PBSで洗浄し接着活性の測定に用いた。継代培養中のBHK細胞を、0.25%トリプシン、0.02%EDTAを含むPBS中で37℃、2分間インキュベートしてはく離した後、10mlの氷冷し

たDME/HEPES生理的食塩水（1:1）に懸濁させた。ここで、DMEは、ダルベッコの最小培地を表し、HEPES生理的食塩水は、137mM NaCl、及び3mM KClを含む20mM HEPESバッファー（pH7.1）を表す。遠心分離で上清を除き、細胞を1mgの大豆・トリプシン・インヒビターを含む氷冷DME/HEPES生理的食塩水10mlに懸濁させた。遠心し、細胞を集め、大豆・トリプシン・インヒビターを含まない氷冷DME/HEPES生理的食塩水で洗浄した後、細胞を $5 \times 10^6 - 1 \times 10^6 / ml$ となるようにDMEに懸濁した。この細胞懸濁液を試料を吸着させたプレートに添加し、37℃で、1時間インキュベートした。37℃のDME/HEPES生理的食塩水で洗浄し、未吸着の細胞を除き、残った細胞を4%ホルマリン/PBSで固定し、顕微鏡下に細胞の伸展を観察した。R-S配列が導入された各IgGは細胞接着活性を示し、対照のIgGは細胞接着活性を示さない。

【0027】実施例4

〔抗原結合能の測定〕

(1) 抗原の合成

改変IgGの抗原結合能を測定するため、抗原としてホスホリルコリン(PC)をキーホール・リムペット・ヘモシアニン(KLH)に結合させたPC-KLHを合成した。以下に、その手順を示す。30mgのp-アミノフェニルホスホリルコリンを1.5mlの0.2Nの塩酸に溶かし、0.2Mの亜硝酸ナトリウム溶液を1時間かけて過剰量となるように滴下した。この場合、約500μlの0.2M亜硝酸ナトリウムを要し、ヨウ素-カリウム・デンプン紙により過剰量であることを確認した。この溶液1.26mlをあらかじめ56mgのKLHを5mlの70mMホウ酸ナトリウム、pH9.0、80mM NaClに溶かした溶液に、室温で10分間かけて滴下した。この後、4℃で17時間かくはんしながら反応させた。反応後、PBSに対して透析し、PC-KLH溶液(8mg/ml)を得た。

(2) 抗原結合能の測定

100μg/mlのPC-KLHを含むPBSを96穴ダイヤルプレートに1穴当り、50μl添加し、室温で1時間吸着させた。吸着後、余分のPC-KLH溶液を除去し、1%BSAを含むPBSを1穴当り100μl添加し、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、0.1%ツィーン20を含むPBSで洗浄し、改変IgG、CT1及びCT2、及び対照のIgG溶液を1穴当り50μl添加し、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、0.1%ツィーン20を含むPBSで洗浄し、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG・Fc断片抗体のPBS溶液を、1穴当り50μl添加、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、0.1%ツィーン20を含むPBSで洗浄し、過酸化水素水・o-フェニレンジアミン溶液を添加

17

18

し、室温で20分間反応させ、1M硫酸で反応を止めた。反応液の492nmの吸収を測定することにより、IgGの抗原に対する結合能を測定した。この結果、改変IgG、CT1及びCT2、及び対照のIgGは抗原に*

*に対し、同程度の結合能を保持していることが確認できた。実施例3、及び実施例4の結果を表1に示す。

【0028】

【表1】

表 1

| 試 料 | 細胞接着活性 | 抗原結合能 |
|---------------------|--------|-------|
| FN | +++ | |
| R-S配列が導入された IgG CT1 | + | + |
| " CT2 | ++ | + |
| R-S配列が導入されていない IgG | - | + |

【0029】

【発明の効果】以上述べてきたごとく、本発明により、抗体の抗原結合活性と新たな細胞接着活性を合せ持つ人工多機能性抗体が提供される。本多機能性抗体は、マクロファージの貪食作用を促進し、他のエフェクター細胞も活性化して生体防御に寄与する有用な物質である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号：2

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

配列番号：3

配列の長さ：5

配列：

AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG GCTAAGGTGA 60

GGCAGGTGGC GCCAGCAGGT GCACACCCAA TGCCCATGAG CCCAGACACT GGACGCTGAA 120

CCTCGCGGAC AGTTAAGAAC CCAGGGCCT CTGCGCCTGG GCCCAGCTCT GTCCCACACC 180

GCGGTCACAT GGCAACCACCT CTCTTGCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TOG GTC 232

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

1 5

TTC CCC CTG GCA CCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG 277

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

| | |
|--|------|
| 19 | 20 |
| GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 25 30 35 | 322 |
| GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe 40 45 50 | 367 |
| CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val 55 60 65 | 412 |
| GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 70 75 80 | 457 |
| AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val 85 90 95 | 502 |
| GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGGAA GCAGGCTCAG CGCTCCTGCC TGGACGCATC CGGGCTATGC AGCCCCAGTC CAGGGCAGCA AGGCAGGGCC CGTCTGCC TTCACCCGGA GCCTCTGCC CCCCCACTCA TGCTCAGGGA GAGGGCTTC TGGCTTTTC CCAGGCTCTG GGCAAGGCACA GGCTAGGTGC CCCTAACCCA GGCCCTGCAC ACAAAGGGC AGGTGCTGGG CTCAGACCTG CCAAGAGCCA TATCCGGGAG GACCCCTGCC CTGACCTAAG CCCACCCAA AGGCCAAACT CTCCACTCCC TCAGCTCGGA CACCTCTCT CCTCCAGAT TCCAGTAACT CCCAATCTTC TCTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr 1 5 | 562 |
| CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAAGCCAG CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 10 15 | 622 |
| TCAAGGCGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCTCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 1 5 | 682 |
| TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 10 15 20 | 742 |
| TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 25 30 35 | 802 |
| GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 40 45 50 | 862 |
| GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 55 60 65 | 914 |
| ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 70 75 80 | 965 |
| CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 85 90 95 | 1025 |
| CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC | 1167 |
| | 1122 |
| | 1212 |
| | 1257 |
| | 1302 |
| | 1347 |
| | 1393 |

21

22

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110
 GTGGGTGCG AGGGCACAT GGACAGAGGC CGGCTGGCC CACCTCTGC CCTGAGAGTG 1453
 ACCGCTGTAC CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC 1506
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 1 5
 ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC 1551
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 10 15 20
 CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG 1596
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 25 30 35
 GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG 1641
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 40 45 50
 CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG 1686
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 55 60 65
 CTC ACC GTG GAC AAG AGC ACC GGC CGG GGC GAC AGC CCT AGG TGG 1731
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Arg Trp
 70 75 80
 CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG 1776
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 85 90 95
 CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA 1821
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105 110
 TGAGTGCAC GGGCGCAAG CCCCCTCCC CGGGCTCTCG CGGTGCCACG AGGATGCTTG 1881
 GCACGTACCC CCTGTACATA CTTCCGGGC GCCCAGCATG GAAATAAACG ACCCAGCGCT 1941
 GCCCTGGGCC CCTGCGAGAC TGTGATGGTT CTTTCCACG 1980

配列番号 : 5

* 209-502 E CDS

配列の長さ : 2009

503-890 E intron 2

配列の型 : 核酸

891-935 E CDS

鎖の数 : 2本鎖

936-1053 E intron 3

トポロジー : 直鎖状

1054-1383 E CDS

配列の種類 : Genomic DNA

1384-1479 E intron 4

配列の特徴 :

1480-1800 E CDS

1-208 E intron 1

* 1902-1908 E poly A signal

配列 :

AGCTTCTGG GGCAGGCCAG CCCTGACCTT GGCTTGGGG CAGGAGGG GCTAAGGTGA 60
 GGCAGGTGGC GCCAGCAGGT GCACACCAA TGCCCATGAG CCCAGACACT GGACGCTGAA 120
 CCTCGGGAC AGTTAAGAAC CCAGGGCCT CTGGCCTGG GCCCAGCTCT GTCCCCACACC 180
 GCGGTACAT GGCACCACCT CTCTTGCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC 232
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 1 5
 TTC CCC CTG GCA CCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG 277
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 10 15 20
 GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG 322
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 23 | | | 24 |
| 25 | 30 | 35 | |
| GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC | | | 367 |
| Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe | | | |
| 40 | 45 | 50 | |
| CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG | | | 412 |
| Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val | | | |
| 55 | 60 | 65 | |
| GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC | | | 457 |
| Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys | | | |
| 70 | 75 | 80 | |
| AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT | | | 502 |
| Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGAA GCAGGCTCAG CGCTCCTGCC | | | 562 |
| TGGACGCATC CCGCTATGC AGCCCCAGTC CAGGGCAGCA AGGCAGGCC CGTCTGCCTC | | | 622 |
| TTCACCCGGA GCCTCTGCC GCCCCACTCA TGCTCAGGGA GAGGGTCTTC TGGCTTTTC | | | 682 |
| CCAGGCTCTG GGCAAGGACA GGCTAGGTGC CCCTAACCCA GGCCCTGCAC ACAAAGGGC | | | 742 |
| AGGTGCTGGG CTCAGACCTG CCAAGAGCCA TATCCGGGAG GACCCCTGCC CTGACCTAAG | | | 802 |
| CCCACCCAA AGGCCAAACT CTCCACTCCC TCAGCTCGGA CACCTTCCT CCTCCAGAT | | | 862 |
| TCCAGTAACT CCCAATCTTC TCTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT | | | 914 |
| Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr | | | |
| 1 | | 5 | |
| CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC | | | 965 |
| His Thr Cys Pro Pro Cys Pro | | | |
| 10 | 15 | | |
| TCAAGGCGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCC AGCCGGGTGC | | | 1025 |
| TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG | | | 1077 |
| Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro | | | |
| 1 | | 5 | |
| TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC | | | 1122 |
| Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile | | | |
| 10 | 15 | 20 | |
| TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC | | | 1167 |
| Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His | | | |
| 25 | 30 | 35 | |
| GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG | | | 1212 |
| Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu | | | |
| 40 | 45 | 50 | |
| GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC | | | 1257 |
| Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser | | | |
| 55 | 60 | 65 | |
| ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG | | | 1302 |
| Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp | | | |
| 70 | 75 | 80 | |
| CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC | | | 1347 |
| Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC | | | |
| Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys | | | |
| 100 | 105 | 110 | |

25

26

GTGGGGTGC GAGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG 1453
 ACCCCTGTAC CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC 1506
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 1 5
 ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC 1551
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 10 15 20
 CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG 1596
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 25 30 35
 GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG 1641
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 40 45 50
 CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG 1686
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 55 60 65
 CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA 1731
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 70 75 80
 TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG 1776
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 85 90 95
 AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGAGTGCGAC GGCCGGCAAG CCCCCGCTCCC 1830
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 10
 0 105
 CGGGCTCTCG CGGTGCGCACG AGGATGCTTG GCACGTACCC CCTGTACATA CTTCCCGGGC 1890
 GCCCAGCATG GAAATAAAGC ACCCAGCGCT GCCCTGGGCC CCTGGCAGAC TGTGATGGTT 1950
 CTTTCCACGG GTCAAGGCCGA GTCTGAGGCC TGAGTGGCAT GAGGGAGGCA GAGCGGGTC 2009

配列番号：6

* 配列の長さ：44

配列の長さ：4

30 配列の型：核酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly Arg Gly Asp

1

*

配列番号：7

配列：

GAAGAGCCTC TCCCTCGGCC GGGCGACTC TCCGGTAAA TGAG 44

配列番号：8

配列：

配列の長さ：32

G AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGAG 32

配列の型：核酸

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

鎖の数：1本鎖

1 5

トポロジー：直鎖状

※ 配列番号：9

配列の種類：Genomic DNA

※ 配列の長さ：44

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：Genomic DNA

27

28

配列：

G AAG AGC CTC TCC CTC GGC CGG GGC GAC TCT CCG GGT AAA TGAG 44
 Lys Ser Leu Ser Leu Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Lys

1

5

10

配列番号：10

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

配列番号：11

*

配列：

ACCGTGGACA AGAGCACCGG CCGGGGCGAC AGCCCTAGGT GGCAGCAGGG G 51

配列番号：12

※配列の長さ：51

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

20 トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG 30

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

1

5

10

配列番号：13

※

配列：

ACC GTG GAC AAG AGC ACC GGC CGG GGC GAC AGC CCT AGG TGG CAG 45

Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Arg Trp Gln

1

5

10

15

CAG GGG

51

Gln Gly

配列番号：14

★配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の長さ：20

ハイポセティカル配列：NO

配列の型：核酸

アンチセンス：YES

鎖の数：1本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

1-29 E primer

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ハイポセティカル配列：NO

40 CCCGGATCCG TGGAAAGAAC CATCACAGT 29

アンチセンス：NO

【図面の簡単な説明】

配列の特徴：

【図1】プラスミドpSV2-HG1gpの構成を示す図である。

1-20 E primer

【図2】図1のプラスミドの一部の、制限酵素の切断部位及びヒトIGH鎖の定常部をコードする領域を示す図である。

配列：

GGGCTCTCGC GGTGCGACGA 20

【図3】プラスミドpUC-CH3の構築工程を示す図である。

配列番号：15

【図4】プラスミドpUC118-HG1の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

★50 びその制限酵素の切断部位を示す図である。

【図5】プラスミドpUCCT1・POLAPCRの構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

【図6】プラスミドpSV2・HG1・gpt・CT1の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

【図7】プラスミドpUC19-CT2の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

【図8】プラスミドpUC19-CT2・POLAPCRの構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

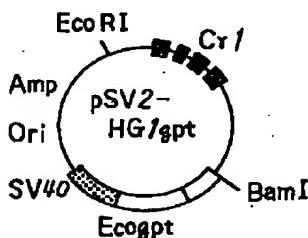
* 【図9】プラスミドpSV2・HG1・gpt・CT2の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

【図10】プラスミドpSV2・HG1・Vpc・CT1の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

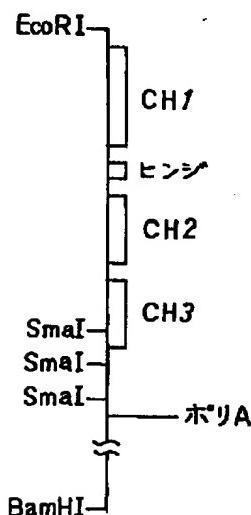
【図11】プラスミドpSV2・HG1・Vpc・CT2の構築工程及びその制限酵素の切断部位を示す図である。

* 10

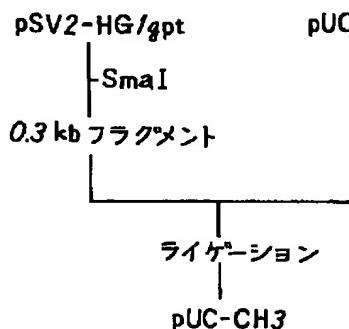
【図1】



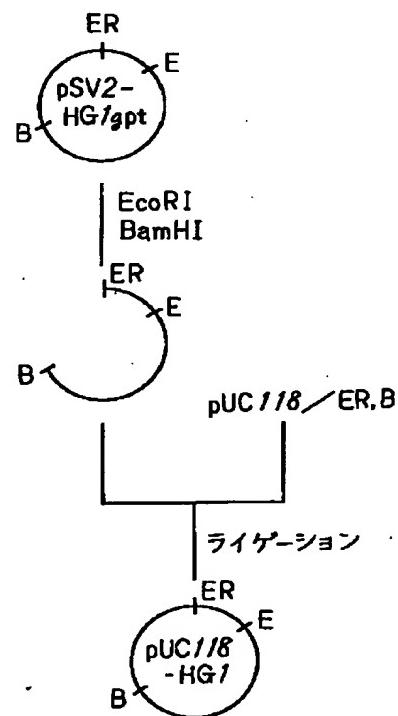
【図2】



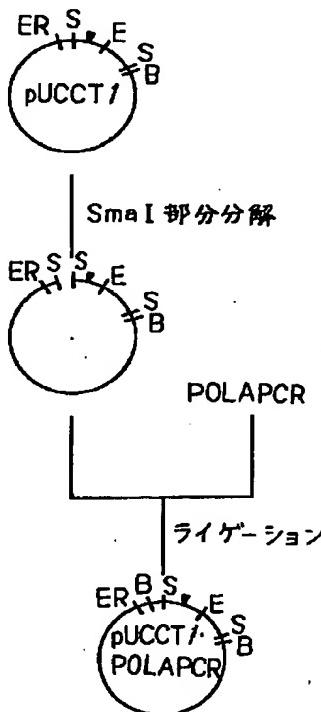
【図3】



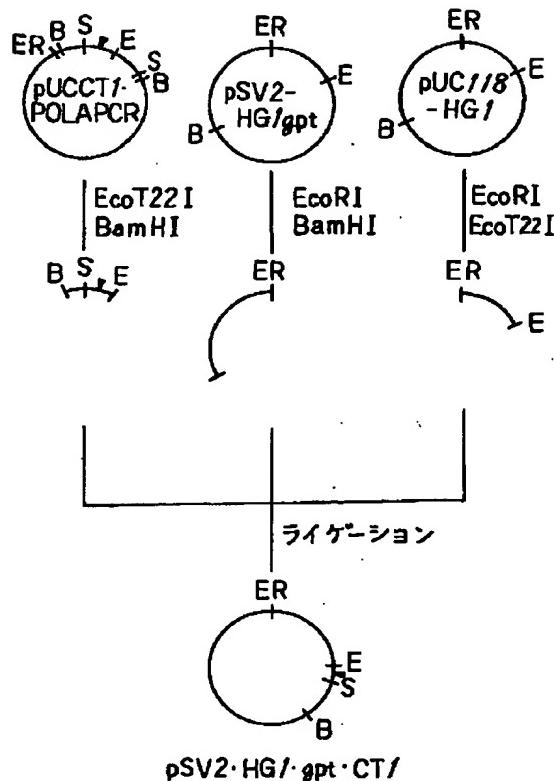
【図4】



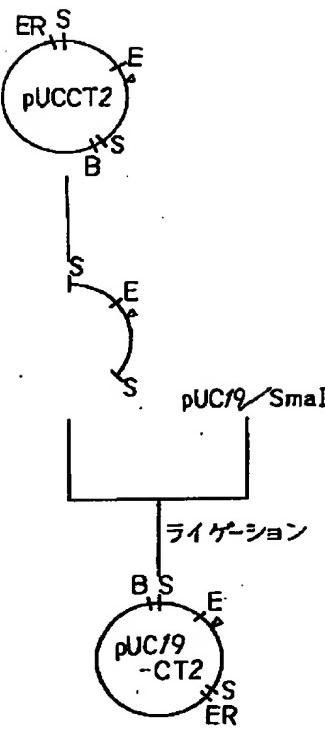
【図5】



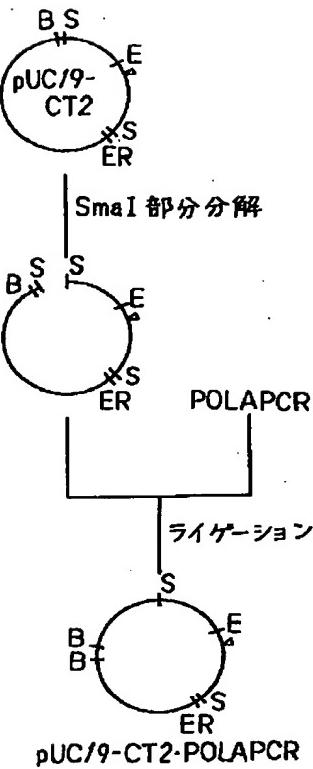
【図6】



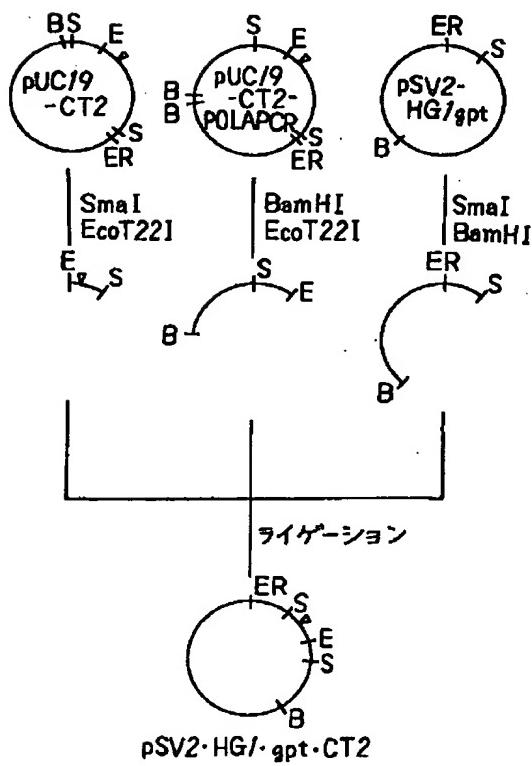
【図7】



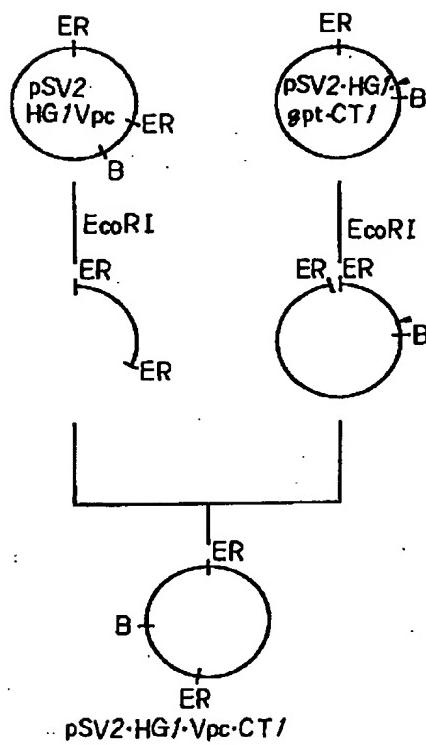
【図8】



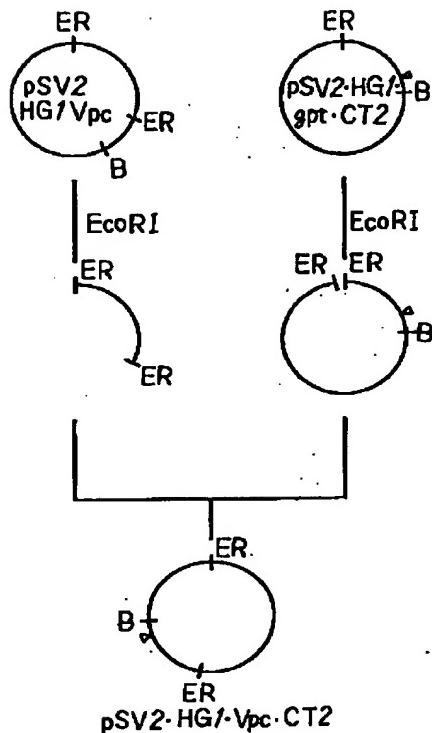
【図9】



【図10】



【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成5年5月14日

【手続補正1】

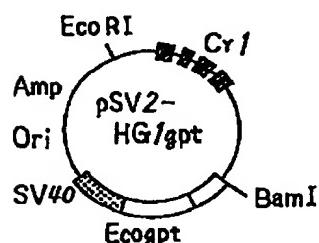
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

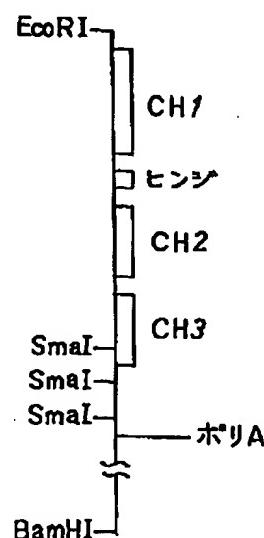
【補正方法】変更

【補正内容】

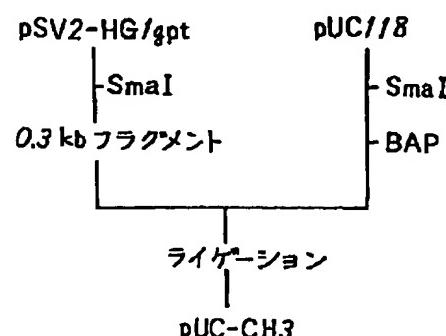
【図1】



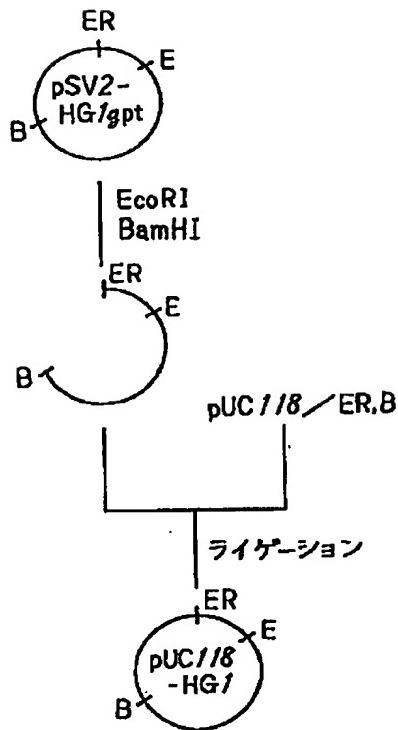
【図2】



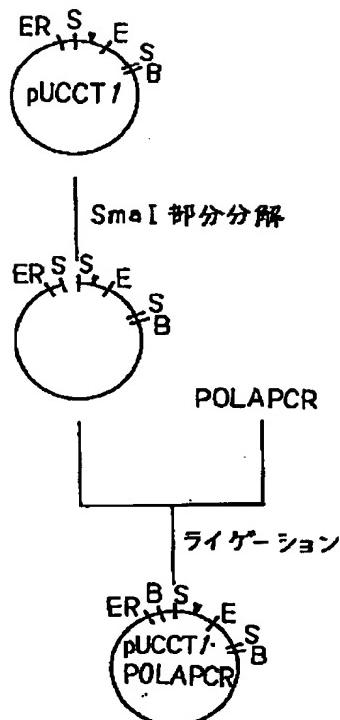
【図3】



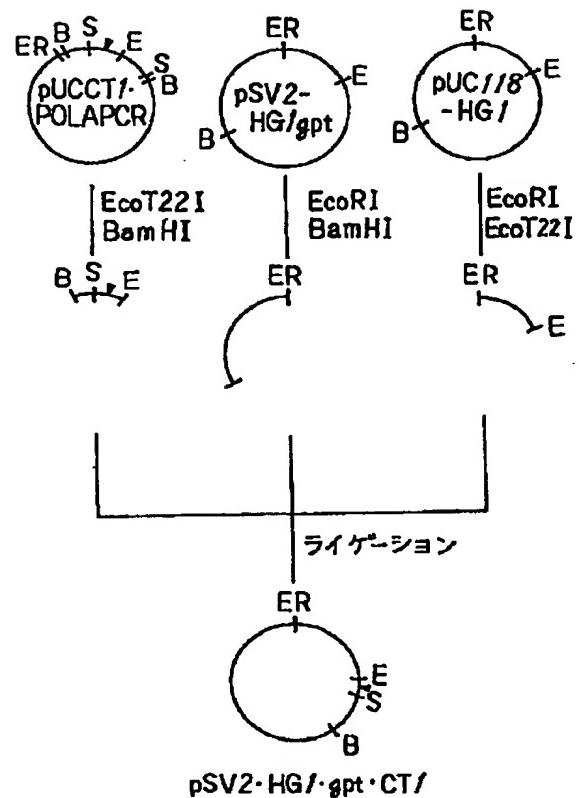
【図4】



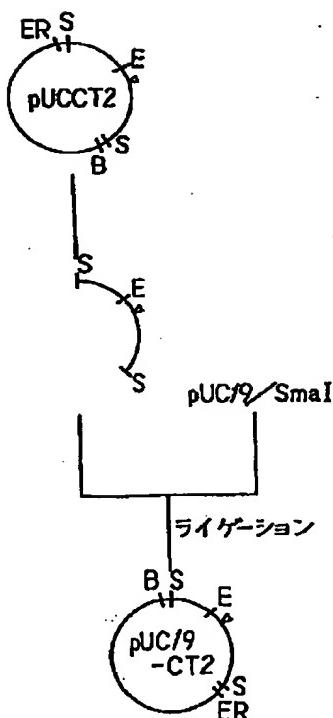
【図5】



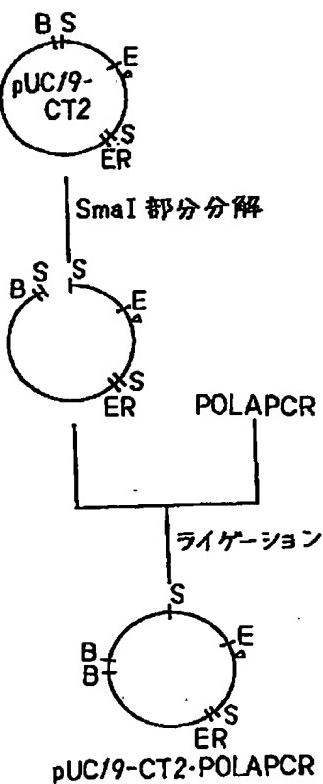
【図6】



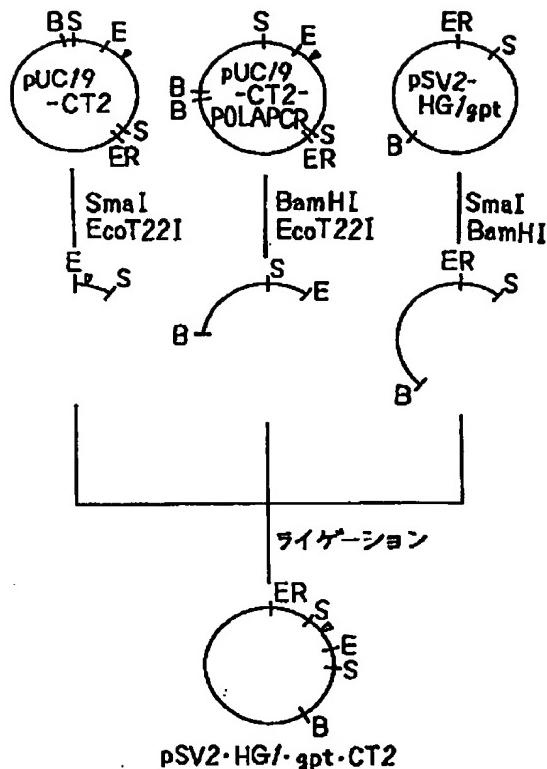
【図7】



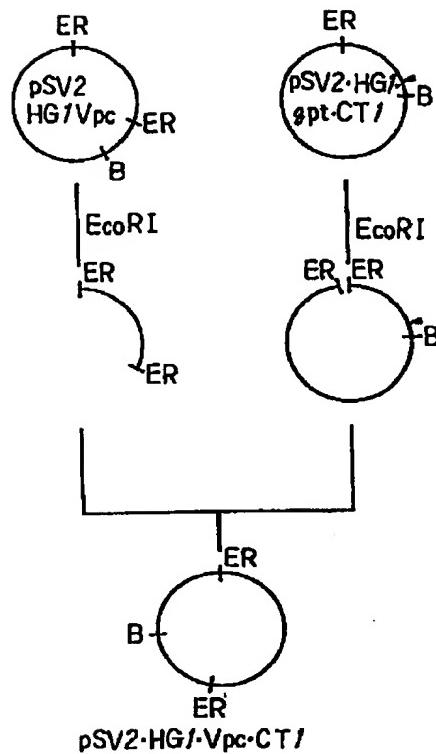
【図8】



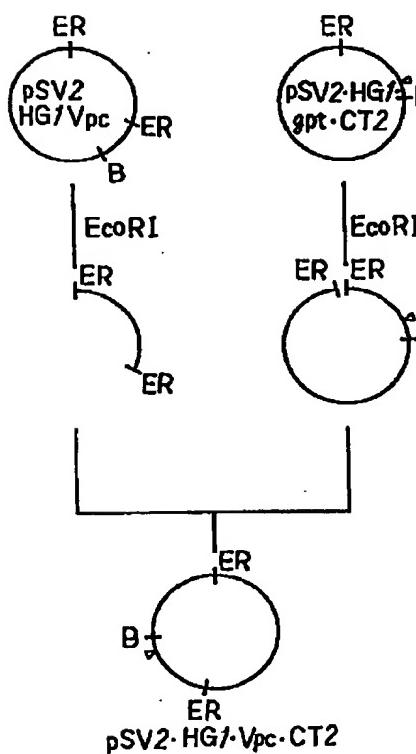
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁵ | 識別記号 | 府内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-------|-----------|-----|--------|
| C 0 7 K 15/12 | | 8517-4H | | |
| C 1 2 P 21/08 | | 8214-4B | | |
| // C 1 2 N 15/13 | Z N A | | | |
| 15/62 | | | | |
| C 1 2 P 21/02 | | C 8214-4B | | |
| (C 1 2 P 21/08 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |

(72) 発明者 加藤 郁之進
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賽酒造
 株式会社中央研究所内

(72) 発明者 黒澤 良和
 愛知県名古屋市名東区扇町1丁目39番地

(72) 発明者 千谷 晃一
 愛知県春日井市岩成台8丁目3番地6

(72) 発明者 関口 清俊
 愛知県名古屋市緑区篠の風1丁目1114番地